

Variasi dan kekerabatan genetik pada dua jenis baru belimbing (*Averrhoa leucopetala* Rugayah *et* Sunarti *sp nov* dan *A. dolichorpa* Rugayah *et* Sunarti *sp nov.*, Oxalidaceae) berdasarkan profil Random Amplified Polymorphic DNA

Kusumadewi Sri Yulita

Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi- LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911, **Email:** yulita.kusumadewi@gmail.com

ABSTRACT

Genetic variation and relatedness of two new species of star fruit (*Averrhoa leucopetala* Rugayah *et* Sunarti *sp nov* and *A. dolichorpa* Rugayah *et* Sunarti *sp nov.*, Oxalidaceae) based on Random Amplified Polymorphic DNA. Two wild species of *Averrhoa* from Papua and Gorontalo respectively has recently been described. These two species were previously treated as ‘intermediate species’ between *A. carambola* and *A. blimbi* on the basis of morphological characters. This present study aimed to assess genetic variation and genetic relatedness of the two species compared to their relatives (*A. carambola* and *A. blimbi*) by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Five RAPD primers (OPA 9E, OPA 13, OPB 7, OPB 18 dan OPN 12) were used to amplify total DNA genom and produced 31 bands to which 90.32% were polymorphic. These bands were ranging in size from 300-1700 bp. DNA fingerprints for each species was indicated by differences in RAPD profiles resulted from amplification of five primers. Clustering analysis was performed based on RAPD profiles using the UPGMA method. The genetic similarity range between 0.25-1.00 indicating wide range of genetic variations observed. Results also indicated that the two species were genetically distant from *A. carambola* and *A. blimbi*, thus supported the recent morphological treatment.

Key words: *Averrhoa*, RAPD profiles, genetic variations.

PENDAHULUAN

Belimbing (*Averrhoa* L.) merupakan buah yang cukup populer di Indonesia dan sudah lama dibudidayakan untuk dimanfaatkan sebagai buah meja, sayur dan obat. Ada dua jenis belimbing yang dikenal oleh masyarakat luas, yaitu belimbing wuluh (*A. blimbi* L.) dan belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.). Belimbing tersebar luas di Asia

Tenggara, namun ada yang menduga berasal dari Amerika Selatan (Brasil) walaupun adapula dugaan bahwa asal usul belimbing adalah Asia Tenggara (Samson 1997).

Selain kedua jenis belimbing ini, beberapa ahli taksonomi tumbuhan (Kooders & Valetton 1903; Kunth 1931) telah mengenal beberapa taksa belimbing dibawah tingkat jenis, yaitu *A. carambola* var *angusticepala* Proyek

(dari Amerika Selatan), *A. carambola* f. *acida* K. & V. dan *A. carambola* f. *dulcis* K. & V (dari Jawa), serta *A. blimbi* f. *papuana* Kunth. (dari Papua).

Rugayah & Sunarti (2008) mendeskripsikan dua jenis baru belimbing, yaitu *Averrhoa leucopetala* Rugayah et Sunarti sp nov dan *Averrhoa dolichorpa* Rugayah et Sunarti sp nov. berdasarkan koleksi hidup belimbing yang ada di Kebun Raya Bogor yang masing-masing berasal dari Gorontalo (Sulawesi) dan Papua. Sebelumnya kedua jenis belimbing ini dinyatakan sebagai jenis 'intermedia' antara belimbing manis dan belimbing wuluh karena memiliki karakter morfologi yang merupakan campuran antara belimbing manis dan belimbing wuluh. Berdasarkan pengamatan morfologi yang telah mereka lakukan, mereka menemukan perbedaan karakter daun, perbungaan, bunga dan buah kedua jenis baru ini dengan belimbing wuluh dan belimbing manis. Berdasarkan karakter vegetatif, *A. leucopetala* dan *A. dolichorpa* mirip dengan *A. carambola*, sedangkan berdasarkan karakter generatif kedua jenis tersebut lebih mirip dengan *A. blimbi* (Rugayah & Sunarti 2008).

Penggunaan karakter selain morfologi, misalnya anatomi, sitologi dan molekuler sudah umum dilakukan untuk mengklarifikasi status taksonomi suatu takson. *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan salah satu marka molekuler yang telah banyak digunakan sebagai *tool* untuk memecahkan dan mengklarifikasi masalah taksonomi, seperti deteksi hibrid (Allan et al. 1997; Fernandez & Coulman

2002; Shasany et al. 2005), spesies kompleks (Stammers et al. 1994; Sebastiani et al. 2001; Zervakis et al. 2001) dan kekerabatan genetik (Fernandez & Coulman 2002; Martin et al. 2002). RAPD dilakukan dengan menggunakan teknik amplifikasi PCR terhadap total DNA genom dengan menggunakan primer tunggal yang dibuat secara random. Kelebihan utama dari RAPD adalah proses yang cepat dan efisiensi biaya dalam hal operasional. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman dan kekerabatan genetik *A. leucopetala* dan *A. dolichorpa* dengan kerabatnya yaitu belimbing manis dan belimbing wuluh berdasarkan profil RAPD.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel belimbing yang dianalisis sejumlah delapan aksesori (Tabel 1), yang terdiri atas *A. leucopetala* (1 aksesori) yang berasal dari Gorontalo dan *A. dolichorpa* (2 aksesori) yang berasal dari Papua dikoleksi dari Kebun Raya Bogor. Selain dua jenis ini juga dilakukan koleksi terhadap belimbing wuluh (2 aksesori) dan belimbing manis (3 kultivar) dari Kebun Plasma Nutfah LIPI (cv *Dewi* dan *Rawasari*) dan dari Kabupaten Demak (cv *Kunir*). Sampel dikoleksi dalam bentuk daun yang dikeringkan dalam silica gel.

Total DNA genom diisolasi dengan menggunakan protokol CTAB (Doyle & Doyle 1990) yang dimodifikasi dengan perlakuan RNase 200 µg/mL. Lima µL total DNA genom dielektrophoresis dalam 0.7% gel agarosa dalam larutan

Tabel 1. Daftar nama sampel belimbing.

Nomor aksesori	Nama jenis	Asal
IP3	<i>A. leucopetala</i>	Gorontalo
VI.C.310 ^a	<i>A. dolichorpa</i>	Papua (Koleksi KRB)
VII.D.96	<i>A. dolichorpa</i>	Papua (Koleksi KRB)
B3	<i>A. carambola</i> cv <i>Dewi</i>	KPN-CSC
B4	<i>A. carambola</i> cv <i>Rawasari</i>	KPN-CSC
B20	<i>A. carambola</i> cv <i>Kunir</i>	Kabupaten Demak, Jawa Tengah
TT401	<i>A. blimbi</i>	Jawa Barat
TT402	<i>A. blimbi</i>	Jawa Barat

penyangga TAE, kemudian diwarnai dengan ethidium bromida dan difoto dengan menggunakan *gel documentation system* (Atto Bioinstrument). DNA yang telah diisolasi disimpan dalam -20°C.

Amplifikasi RAPD dilakukan dengan menggunakan lima primer RAPD (Operon Technologies Almeda, Calif., USA) dalam mesin PCR Takara *thermocycler* mengikuti protokol Williams *et al.* (1990), sebagai berikut: denaturasi pada 94°C selama 2 menit, diikuti oleh 45 siklus amplifikasi yang terdiri atas fase denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, fase penempelan primer pada suhu 36°C selama 1 menit dan tahap pemanjangan pada suhu 72°C selama 2 menit. Siklus ini dilanjutkan dengan tahap pemanjangan pada suhu 72°C selama 2 menit yang diakhiri dengan tahap pendinginan hasil PCR pada suhu 25°C. Volume reaksi total PCR adalah 15 ml yang terdiri atas 1x PCR *Green Master Mix* (Promega), 2 µM primer (Operon Technologies Almeda, Calif., USA), dan ~10 ng DNA *template*. Hasil amplifikasi PCR kemudian dipisahkan secara elektroforesis dalam

2% gel agarosa yang direndam dalam larutan penyangga TAE 1X pada tegangan listrik 50 Volt selama 120 menit. Gel agarosa kemudian diwarnai dalam 0.5 mg/ml larutan etidium bromida dan divisualisasi serta difoto menggunakan *gel documentation system* (Atto Bioinstrument). Reaksi PCR diulang sebanyak dua kali untuk memastikan keberulangan dan konsistensi hasil PCR.

Pita RAPD diskor secara manual berdasarkan profil RAPD hasil foto gel elektroforesis. Setiap pita RAPD dianggap sebagai satu lokus putatif. Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk diskor 1 bila ada pita dan 0 bila tidak ada pita. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program NTSys-PC (*Numerical Taxonomy System*, versi 2.02i, Rohlf 1998). Data yang telah diskor kemudian dikelompokkan hingga membentuk matriks binari di program Microsoft Excel. Matriks tersebut kemudian diolah menggunakan program SIMQUAL (*Similarity for qualitative data*) untuk menghitung koefisien kesamaan Jaccard. Matriks kesamaan ini kemudian digunakan untuk membuat dendrogram

UPGMA (*unweighted pair group method with arithmethical average*) dan *Principal coordinate analysis*.

HASIL

Profil Umum Pita RAPD

Amplifikasi PCR-RAPD terhadap total DNA genom dari kedelapan aksesi belimbing dengan menggunakan lima primer (OPA 9E, OPA 13, OPB 7, OPB 18 dan OPN 12) menghasilkan 31 pita DNA yang dapat diskor. Jumlah pita yang dihasilkan berkisar antara 2 (OPB 18) hingga 11 (OPN 12) dengan ukuran pita berkisar antara 300 pb hingga 1700 bp (Tabel 2). Dari keseluruhan pita ini, 90.32 % adalah pita polimorfik dengan rata-rata jumlah pita polimorfik 5.4 per primer.

Variasi genetik yang dijumpai pada seluruh aksesi belimbing umumnya diperoleh dari perbedaan profil RAPD. Sebagian besar 31 pita RAPD dijumpai

pada seluruh aksesi (Gambar 1a-e). Pita umum yang dijumpai pada seluruh aksesi adalah OPA 9E ukuran 900 bp, OPA 13 ukuran 800 bp dan OPB 18 ukuran 600 bp (Tabel 2; Gambar 1a, b dan d). Selain itu, dijumpai pula pita spesifik yang hanya dijumpai pada jenis atau aksesi tertentu (Tabel 2; Gambar 1a-e) yang dapat digunakan untuk karakterisasi jenis atau kultivar tertentu dapat digunakan untuk karakterisasi jenis *A. carambola* dan *A. blimbi* karena terdapat pita spesifik ukuran 1100 pada jenis *A. carambola* serta pita ukuran 350 dan 650 bp pada jenis *A. blimbi* (Gambar 1a). Sedangkan primer OPA 13 dapat digunakan untuk karakterisasi jenis *A. carambola* dan *A. dolichorpa* karena terdapatnya pita spesifik ukuran 1200, 1500, 1700 pada *A. carambola* cv *Rawasari*, serta pita ukuran 600 bp pada *A. dolichorpa* (Gambar 1b). OPB 7 dapat digunakan untuk karakterisasi kultivar belimbing

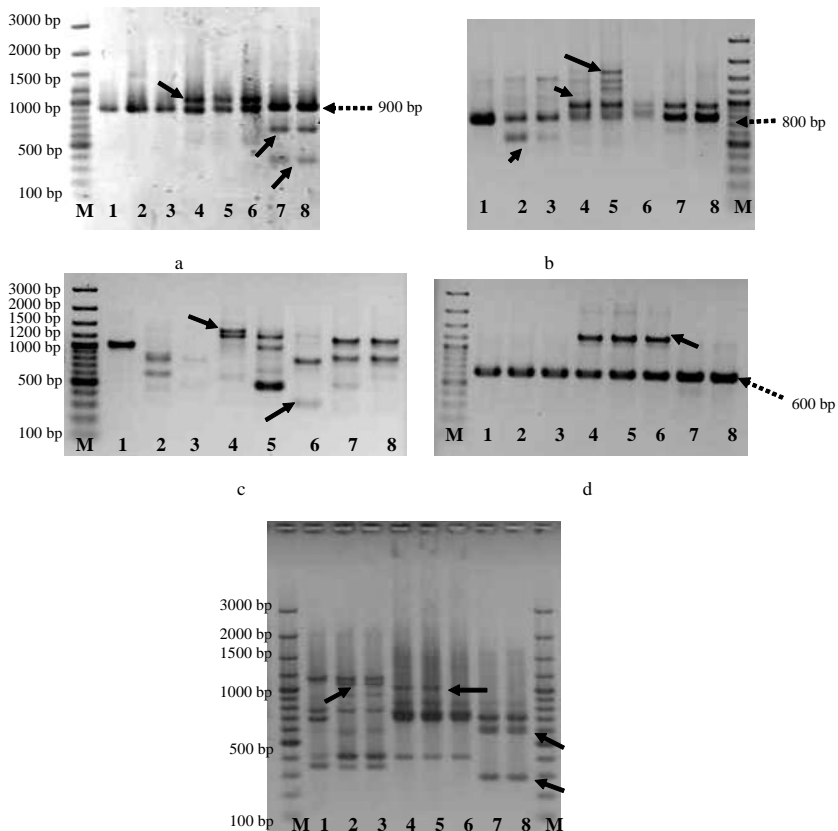
Tabel 2. Nama primer, urutan DNA, pita polimorfik dan sebarannya pada setiap jenis / kultivar. Huruf cetak tebal adalah nukleotida tambahan. 1) *A. leucopetala*, 2) *A. dolichorpa*, 3) *A. carambola*, 4) *A. blimbi*.

Nama primer	Urutan DNA primer	Jumlah dan ukuran pita terpendek-terpanjang (bp)	Ukuran pita umum (bp)	Ukuran pita unik pada setiap jenis belimbing (bp)			
				1	2	3	4
OPA 9E	5' TTGGGTAACGCC 3'	4 (350-1100)	900	-	-	1100	350 650
OPA 13	5' CAGCACCCAC 3'	6 (600-1700)	800	-	600	1200, 1500, 1700 (cv Rawasari)	-
OPB 7	5' GGTGACGCAG 3'	7 (350-1700)	-	-	-	350 (cv Kunir) 1200 (cv Dewi)	-
OPB 18	5' CCACAGCAGT 3'	2 (600-1500)	600	-	-	1500	-
OPN 12	5' CACAGACACC 3"	11 (300-1400)	-	-	110 0	900	300, 600

manis dengan terdapatnya pita spesifik ukuran 350 bp pada *A. carambola* cv *Kunir* dan 1200 bp pada *A. carambola* cv *Dewi* (Gambar 1c). Sedangkan OPB 18 hanya dapat digunakan untuk karakterisasi ketiga kultivar belimbing manis (Gambar 1d). Primer OPN dapat digunakan untuk karakterisasi *A. carambola* (pita ukuran 900 bp) dan *A. blimbi* (pita ukuran 300 dan 600 bp) (Gambar 1e).

Analisis pengelompokan

Analisis kluster menunjukkan pemisahan tanaman belimbing ke dalam kluster yang mengelompok berdasarkan jenisnya (Gambar 2). Nilai koefisien kesamaan genetik kedelapan aksesi duku berkisar antara 25% hingga 100%. Hasil analisis kluster menunjukkan adanya tiga kluster (A, B dan C). Kluster A (koefisien kesamaan 42%) terdiri atas *A.*



Gambar 1. Profil sidik RAPD delapan aksesi belimbing dengan menggunakan primer OPA 9E (a), OPA 13 (b), OPB 7 (c), OPB 18 (d) dan OPN 12 (e). M: GeneRuler 100 bp plus (Fermentas), 1: *A. leucopetala*, 2-3: *A. dolichorpa*, 4-6: *A. carambola*, 7-8: *A. blimbi*. Anak panah garis putus-putus: pita umum. Anak panah garis solid: pita spesifik. Ukuran pita spesifik sesuai dengan Tabel 2.

leucopetala dan *A. dolichorpa*, kluster B (koefisien kesamaan 51%) terdiri atas tiga kultivar blimbing manis (*A. carambola*) dan kluster C (koefisien kesamaan 85%) terdiri atas dua aksesori belimbing wuluh (*A. blimbi*) (Gambar 2). Sementara itu, diagram ordinasi 3-dimensi menunjukkan pengelompokan yang serupa dengan hasil analisis kluster (Gambar 3).

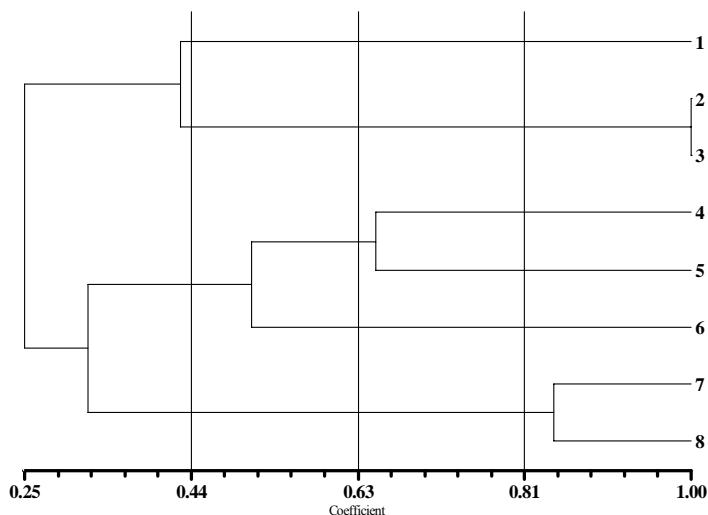
PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap pola pita DNA hasil amplifikasi menunjukkan profil DNA yang berbeda-beda. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan urutan nukleotida pada keempat primer yang digunakan, sehingga menyebabkan perlekatan primer di sepanjang DNA genom sampel juga berbeda. Pita yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA

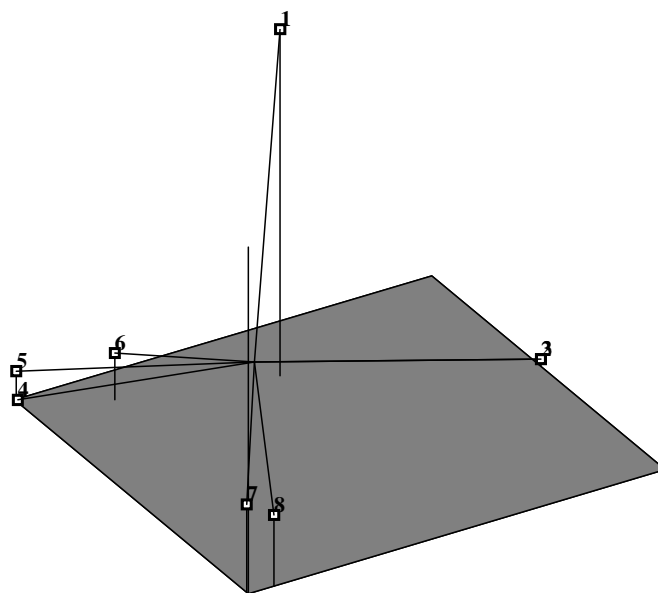
dengan PCR sangat bergantung pada bagaimana primer mengenal daerah komplemennya pada cetakan (*template*) DNA yang digunakan. Semakin banyak situs penempelan dari primer yang digunakan, maka semakin banyak jumlah pita DNA yang dihasilkan (Tingey *et al.* 1994).

Secara umum, hasil amplifikasi total DNA genom sampel belimbing dengan menggunakan primer terpilih menghasilkan serangkaian pita-pita, diantaranya ada pita-pita yang umum dijumpai pada seluruh sampel dan adapula pita spesifik yang hanya ditemukan pada spesies/kultivar tertentu. Keseluruhan profil pita yang dihasilkan dari amplifikasi primer RAPD inilah yang merupakan sidik DNA setiap jenis/kultivar.

Hasil amplifikasi dengan menggunakan lima primer RAPD menunjukkan bahwa terdapat kemiripan yang cukup



Gambar 2. Diagram pengelompokan UPGMA berdasarkan koefisien kesamaan Jaccard pada delapan aksesori belimbing. 1: *A. leucopetala*, 2-3: *A. dolichorpa*, 4-6: *A. carambola*, 7-8: *A. blimbi*. Garis putus-putus vertikal: garis referensi.



Gambar 3. Diagram tiga-dimensi PCA pada delapan aksesori belimbing. 1-2: *A. leucopetala*, 2-3: *A. dolichorpa*, 4-6: *A. carambola*, 7-8: *A. blimbi*. Lingkaran menunjukkan pengelompokan yang sesuai dengan diagram UPGMA pada Gambar 6.

tinggi antara profil RAPD pada *A. leucopetala* dan *A. dolichorpa*. Namun tidak ada pita spesifik yang dapat digunakan untuk mengkarakterisasi *A. leucopetala*. Sedangkan *A. dolichorpa* dapat dikarakterisasi dengan menggunakan primer OPA 13 pada ukuran 600 bp dan primer OPN 12 pada ukuran 1100 bp (Gambar 1b dan 1e). Selain itu, belimbing manis (*A. carambola*) dapat dikarakterisasi dengan menggunakan primer OPA 9E pada ukuran 1100 bp, OPB 18 pada ukuran 1500 bp, serta OPN 12 pada ukuran 900 bp (Gambar 1a, c dan e). Karakterisasi kultivar pada belimbing manis ini dapat dideteksi dengan menggunakan primer OPA 13 (Gambar 1b). Belimbing wuluh (*A. blimbi*) dapat dikarakterisasi dengan menggunakan primer OPA 9E pada

ukuran 350 dan 650 bp, serta primer OPN 12 pada ukuran 300 dan 600 bp (Gambar 1d dan 1e). Ada atau tidaknya pita DNA spesifik sangat dipengaruhi oleh situs penempelan primer pada cetakan DNA. Weising *et al.* (1995) berpendapat bahwa ada beberapa hal yang menyebabkan perbedaan pita DNA yang teramplifikasi, yaitu (1) perubahan nukleotida pada sampel yang mencegah terjadinya amplifikasi, (2) delesi pada pelekatan primer, (3) insersi yang menyebabkan daerah pelekatan primer terlalu jauh untuk menyokong terjadinya amplifikasi dan (4) insersi dan delesi yang mengubah produk amplifikasi.

Setiap primer juga menghasilkan produk amplifikasi yang berbeda spesifitasnya untuk setiap jenis/kultivar.

Dalam hal ini primer OPB 7 sangat polimorfik sehingga tidak menghasilkan pita umum untuk semua jenis yang diamplifikasi, sehingga primer ini kurang cocok bila digunakan untuk karakterisasi jenis/kultivar belimbing (Gambar 1c). Sebaliknya primer OPB 18 (Gambar 1d) menghasilkan produk PCR dengan polimorfisme yang cukup rendah dan hanya berguna untuk karakterisasi belimbing manis. Dengan demikian, primer ideal yang direkomendasi untuk digunakan pada karakterisasi jenis dan kultivar belimbing adalah OPA 9E, OPA 13 dan OPN 12 (Gambar 1a, b dan e).

Hasil analisis pengelompokkan menunjukkan rentang kesamaan genetik antara 25-100% mengindikasikan adanya variasi genetik yang cukup tinggi diantara keempat jenis belimbing. Kelompok belimbing wuluh memiliki nilai koefisien kesamaan yang lebih tinggi (85%) dibanding belimbing manis (51%). Nilai koefisien kesamaan genetik yang tinggi diantara belimbing wuluh artinya keragaman genetik yang lebih sempit. Hal ini mungkin karena belimbing manis memiliki banyak lebih kultivar hasil budidaya yang lebih intensif dibandingkan belimbing wuluh, sehingga memiliki keragaman genetik belimbing manis lebih luas daripada belimbing wuluh. Kisaran koefisien sekitar 50% dengan marka RAPD dapat menunjukkan adanya interspesifik hibrid, sedangkan kisaran 61%-99% merupakan kesamaan genetik dalam tingkat spesies pada tumbuhan Lilac (Marsolais *et al.* 1993), 56% pada *Mentha spicata* dan 49% pada *M. Arvensis* (Shasany *et al.* 2005). Di dalam kluster belimbing manis (B), cv *Kunir*

terpisah dari cv *Dewi* dan cv *Rawasari* yang membentuk kelompok dengan koefisien kesamaan 64%. Untuk mengetahui apakah perbedaan ini disebabkan oleh intraspesifik hibrid pada cv *Kunir*, memerlukan studi lebih lanjut.

A. leucopetala dan *A. dolichorpa* membentuk kelompok tersendiri (42%) yang terpisah dari kelompok belimbing wuluh-belimbing manis (B&C, koefisien kesamaan 32.5%). Sesuai dengan hasil pengamatan morfologi yang dilakukan oleh Rugayah & Sunarti (2008), kedua jenis ini memang berbeda secara morfologi dari belimbing wuluh dan belimbing manis. Perbedaan properti genetik kedua jenis belimbing tersebut dapat mengindikasikan proses radiasi adaptif tersendiri di wilayah persebarannya di Pulau Papua dan Sulawesi. Secara geografi, kawasan Sulawesi dan Papua serta pulau-pulau diantaranya memang memiliki sejarah geologi yang berbeda dengan kawasan Malesia bagian Barat, dipisahkan oleh garis Wallacea.

Dengan demikian, hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian Rugayah & Sunarti (2008) yang mendeskripsikan *A. leucopetala* dan *A. dolichorpa* menjadi jenis baru yang terpisah dari *A. averrhoa* dan *A. blimbi*. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa marka RAPD cukup potensial untuk karakterisasi jenis dan kultivar belimbing, serta memecahkan permasalahan taksonomi seperti spesies kompleks yang ada pada jenis-jenis belimbing. Untuk kerja lanjutan, menggunakan data molekuler yang lebih sensitif mendeteksi polimorfisme pada tingkat nukleotida seperti *DNA*

sequencing kemungkinan besar akan menghasilkan resolusi hasil analisis kluster yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sepenuhnya didukung oleh dana proyek DIPA tahun 2009 yang berjudul “Kajian genetika plasma nutfah buah-buahan Indonesia” Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Terima kasih kepada Ibu Dra. Inggit, Dr. Rugayah, Dr Siti Sunarti, Dr. Teguh Triono, dan Dr. Marlina Ardiyani yang telah berbaik hati memberikan material DNA belimbing wuluh, belimbing *A. dolicharpa* dan *A. leucopetala*. Terima kasih juga kepada Herlina dan Fajarudin Ahmad atas bantuan teknis yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Allan, GJ., C. Clark & LH. Reiseberg. 1997. Distribution of parental DNA markers in *Encelia virginiensis* (Asteraceae: Heliantheae), a diploid species of putative hybrid origin. *Pl. Syst. Evol.* 205: 205-221.
- Doyle, JJ. & JL. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12: 13-15.
- Ferdinandez, YSN. & BE. Coulman. 2002. Evaluating genetic variation and relationships among two bromegrass species and their hybrid using RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 125: 281-291.
- Kooders, SH. & TH. Valeton. 1903. Oxalidaceae. Bijdrage No.9 Boomsroten op Java. Mededeelingen uit's Land Plantentuin 61: 106-113. G. Kolff & Co. Batavia.
- Kunth, R. 1930. Oxalidaceae (*Averrhoa*). Dalam: Engler, A.(ed.). *Pfl. R.* Verlag von Wilhem Engelmann. Leipzig. 95: 417-419.
- Marsolais, JV., JS. Pringle & BN. White. 1993. Assessment of random amplified polymorphic DNA (RAPD) as genetic markers for determining the origin of interspecific lilac hybrids. *Taxon* 42: 531-537.
- Martin, C., E. Uberhuaga & C. Perez. 2002. Application of RAPD markers in the characterisation of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica* 127: 247-253.
- Rohlf, FJ. 1998. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis. Version 1.8. Exeter Software, New York.
- Rugayah & S. Sunarti. Two new wild species of *Averrhoa* (Oxalidaceae) from Indonesia. *Reinwardtia* 12(4): 325-334.
- Samson, JA. 1997. *Averrhoa* L. Dalam:. Verheij, E.W.M & R.E. Coronel (eds). *Buah-buahan yang dapat dimakan. PROSEA Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. 109-112.
- Shasany, AK., MP. Darokar, S. Dhawan, AK. Gupta, S. Gupta, AK. Shukla, NK. Patra & SPS. Khanuja. 2005. *J. Heredity* 96(5): 542-549.
- Sebastiani, F., RR. Meiswinkel, LM. Gomulski, CR. Guglielmino, PS. Mellor, AR. Malacrida & G.

- Gasperi. 2001. Molecular differentiation of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Diptera, Ceratopogonidae), inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol.Ecol.* 10(7): 1773-1786.
- Stammers, M., J. Harris, GM. Evans, MD. Hayward & JW. Forster. 1995. Use of PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity* 74: 19-27.
- Tingey, SV., JA. Rafalski & MK. Hanafey. 1994. Genetic analysis with RAPD markers. Dalam: Coruzzi C. & P. Puidormenech (eds). *Plant Mol. Biol.* Pringer. Berlin. 491-498.
- Williams, JGK., AR. Kubelik, KJ. Livak, JA. Rafalski & SV. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zervakis, GI., G. Venturella & K. Papadopoulou. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology* 147: 3183-3194.

Memasukkan Maret 2011

Diterima: Juli 2011